大鼠发育过程中肝、肺r-GT酶活性和定位

王德青 杨淑珍 金晓琳
(第三军医大学 重庆)

摘要

用生物化学和组织化学方法研究正常发育中大鼠肝、肺r-GT活性和定位。结果表明：肝r-GT活性自胚龄17天开始升高，21天达高峰，出生第一天明显降低，第六天降至接近成年低水平。在胚胎期肝r-GT主要位于肝细胞内，出生后则主要位于胆小管。该结果提示胚胎期肝r-GT主要参与肝细胞膜上氨基酸的转运。出生后可能主要参与解毒功能，大鼠肺r-GT活性随发育逐步升高，主要分布于肺支气管上皮细胞。提示肺r-GT可能参与解毒功能。

关键词：大鼠 组织 γ-谷氨酰转移酶

r-谷氨酰转移酶 (r-Glutamyltransferase, r-GT) (EC、2、3、2、2) 是一种质膜结合糖蛋白。哺乳动物富于吸收和分泌功能的上皮细胞，r-GT呈高活性，如肾、小肠等。该酶催化r-谷氨酰化合物的r-谷氨酰基转移至L-氨基酸或二肽。借此，细胞外某些L-氨基酸以r-谷氨酰基为载体转移至细胞内，完成细胞膜转运。因此认为r-GT的生理功能与某些氨基酸的细胞膜转运有关，此外还认为与谷胱甘肽代谢及对某些毒性物质（包括致癌剂）的解毒作用有关。目前对肾脏r-GT的性质和生理功能了解较多。对肝、肺r-GT的生理功能所知甚少。已报道成年大鼠肝r-GT活性很低，胎儿肝r-GT活性很高。肝癌时r-GT活性也很高，故认为r-GT是诊断肝癌的灵敏指标之一。对成年大鼠肺和胎儿肺r-GT活性测定有两种结果；Albert (1970) 测定结果成年肺r-GT活性是胎儿的1/10；Bodanszky (1980) 报道成年肺是胎儿肺的20倍。

鉴于上述观点的分歧及目前国内尚未见r-GT个体发育方面的报道，我们用生化和组化相配合的方法，对胚龄13，17，19，21天，出生后1，3，6天及成年大鼠肝、肺r-GT活性和定位进行了分析测定，为进一步探讨r-GT的生理功能和临床应用提供动物实验资料。

本文1985年2月1日收到，1985年6月24日收到修改稿。

材料与方法

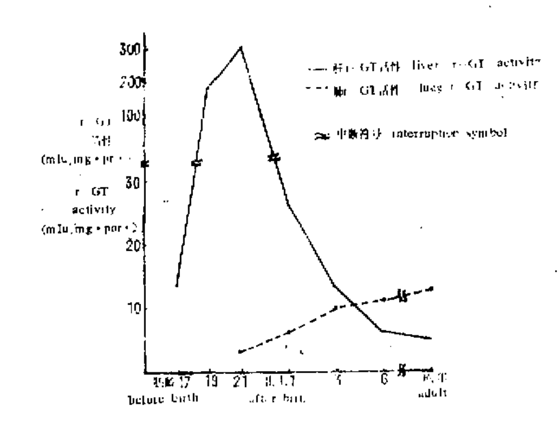
动物：胚龄按阴栓日计算，分别取同窝杂种，胚龄13天，17天，19天，21天。出生1天，3天，6天及成年健康大鼠（240—300天）断头处死后立即取材，分别做生化测定和组化切片。

1.生化方法： 取肝、肺组织，用含0.5%TritonX—100pH7.4的0.05M Tris-HCl缓冲液制成匀浆，离心3000转/分，10分钟。取上清液按 Szasz（1976）法测定r-GT活性。以r-谷氨酰对硝基苯胺为r-谷氨酰供体底物，甘氨酰甘氨酸为受体底物，在pH8.6 0.05M This-HCl缓冲液中加入样品0.1ml，在37°C水浴中保温10分钟，反应释出黄色对硝基苯胺，用721分光光度计，波长410nm，比色测定光密度。空白管除不加基质外与测定管相同。计算每ml样品中r-GT毫国际单位。以每分钟释出1毫摩尔对硝基苯胺为1个毫国际单位。蛋白质测定按Lowry（1951）方法，以Folin酚试剂显色，用721分光光度计，波长660nm，比色测定每毫升样品中蛋白质毫克数。

2.组化方法：（根据Albert法，1961）分别取新鲜肝、肺组织放入液氮内，骤冷10分钟后用“1700”型冷冻切片机切片，厚度10μM。自然吹干后放入80%丙酮液中固定30分钟，放入孵育液中，置37°C温箱内孵育2小时，孵育液的配制：pH6.7 0.1M 磷酸缓冲液10ml溶解r-L-谷氨酰-2-萘胺10mg，坚固兰B 5 mg，明胶甘油封固。另将切片放入无底物r-L-谷氨酰-2-萘胺液体中，其它条件不变，作为对照。

实验结果

大鼠不同发育阶段肝、肺r-GT活性生化测定值及组化半定量染色反应结果见下表：



图Ⅰ 大鼠不同发育阶段与肝、肺r-GT活性关系

Fig. 1. Relativity between different development stage and r-GT activety of liver and lung of the rat.

表 I　　大鼠出生前后肝、肺r-GT活性和定位

Table 1.　　r-GT Activety and location before and after birth of the rat.

发育阶段 development stage	胚龄（天）Old-fetuses (day) 13	17	19	21	出生后（天）After birth (day) 1	3	6	成年 adult
肝脏 Liver $\bar{x} \pm S.D$		13.3 ± 3.4	185.4 ± 12.4	313.7 ± 19.0	26.9 ± 5.0	13.6 ± 1.5	6.4 ± 1.3	5.4 ± 1.1
组化反应和定位	(—)	(-~+) 肝细胞	(++) 主要在肝细胞	(+++) 肝细胞及胆小管	(++) 主要在胆小管	(+~++) 胆小管	(+) 胆小管	(-)
Histochemistry and location		hepatocyte	mainly in the hepato-cyte	hepato cyte and bile canaliculi	mainly in bilee cana-liculi	bile cana-liculi		
例数 (No.)	5	7	7	7	7	5	8	20
肺脏 Lung $\bar{x} \pm S.D$				3.4 ±0.8	6.3 ±1.4	10.0 + 1.1	10.9 ± 1.8	13.3 + 2.4
组化反应 Histochemistry reaction	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-~+)	(-~+)	(++)
例数 (No.)	6	5	6	7	7	6	8	12

注：1. 生化法测定肝、肺r-GT活性均以每毫克组织蛋白的毫国际单位表示　(mIu/mg.Pr)
r-GT activity measured with biochemical method is indecated by mIu/mg. Pr

2. 组化反应标准

(一)：染色物为均匀淡黄色　staineds with pale yellow
(十)：染色物为深黄色　heavy yellow
(++) 染色物为棕黄色　brown yellow
(+++) 染色物为棕红色　brown red

1. **肝r-GT**：由表Ⅰ和图Ⅰ、图Ⅱ（附后）可见成年大鼠肝脏r-GT活性生化检测为5.4±1.1 mIu/mg. Pr.；组化染色为阴性（一）。胚1龄3天因肝脏很小不便取材做生化测定；用完整胚体冰冻切片进行组化染色为阴性（一）。胚龄17天生化测得值为13.3±3.4 mIu/mg. Pr.，是成年大鼠的2.5倍。组化检测偶见肝细胞有深黄色反应物存在（-～+）。胚龄19天生化值明显升高为185.4±12.4mIu/mg.Pr.，为成年大鼠的34.3倍，组化染色主要见肝细胞内有较强的棕黄色反应物（++），胆小管也偶见棕黄色染色物〔图Ⅱ(1)〕。胚龄21天生化值达高峰为313.7±19.0mIu/mg. Pr.，为成年大鼠的58.1倍，组化染色可见肝细胞内及胆小管均有较强的棕红色反应物存在(+++)〔图Ⅱ(2)〕。出生第一天生化值明显降低为26.9±5.0mIu/mg.Pr.，为成年大鼠的5.0倍，组化染色见棕红色反应物主要位于胆小管（++），肝细胞内散在可见〔(图Ⅱ(4)〕。出生第三天生化值为13.5±1.9，为成年大鼠的2.5倍，组化染色明显减弱，主要见胆小管有深黄色反应物(+～++)〔图Ⅱ(4)〕。出生第六天生化值降至接近成年水平，26.9±5.0mIu/mg. Pr.为成年的1.2倍；组化染色r-GT主要胆小管（+）。

2. **肺r-GT**：成年大鼠肺r-GT活性生化值为13.3±2.4；组化染色可见较强的棕黄色反应物(++)位于肺内支气管及细支气上皮〔图Ⅱ(5)(6)〕。肺泡间质为阴性(一)。胚龄13天至19天肺脏很小难于取材做生化测定，胚龄21天生化值为3.4±0.8mIu/mg. Pr.，为成年的25%；出生第一天生化值为6.3±1.4 mIu/mg. Pr.，为成年的47%；出生的第三天生化值为10.0±1.1mIu/mg. Pr.为成年的75%，；出生后第六天生化值为10.9±1.8 mIu/mg. Pr.，为成年的82%。组化染色从胚龄13天至出生第一天肺泡及支气管均为阴性，出生第三天至第六天偶见肺支气管有深黄色反应物出现。

以上结果可见大鼠发育期间肝、肺r-GT活性变化生化测定与组化染色结果基本一致。

讨　论

由结果可见，大鼠肝脏r-GT活性从胚龄17天开始高于成年，21天达高峰，出生当天明显下降，出生后第六天即接近成年水平，该结果与Adjarov（1979）用生化方法测得的结果基本相似。

我们在用生化方法测定发育过程中r-GT活性变化的同时，还用组化方法染色，进行半定量和定位分析，其结果与生化测定完全吻合，取得了互证互补的效果。

如胚龄13天大鼠肝脏发育尚在初级阶段，无法取材用生化法测定，但可用组化法整个胚体冰冻切片染色进行半定量，弥补了生化法之不足，成年大鼠肝脏用生化法测得的r-GT活性很低（5.4±1.1），用组化法也得到证实，均为阴性。如妊娠末期，生化法测得肝r-GT活性达高峰（313.7±19），组化法也达高峰，染色呈强阳性。其它时相点生化与组化结果也基本一致。

Adjarov认为出生前肝r-GT活性升高而出生后降低的原因是由于胎儿发育期间肝脏合成某些蛋白质的功能增强，需要更多的氨基酸转运至肝细胞内，肝r-GT活性增加可能是与肝细胞对氨基酸需要增加相适应。出生后肝脏合成某些蛋白质的功能降低，因而

肝r-GT活性降低。

Chasseaud (1979) 等人证实某些毒物（包括致癌剂），可与谷胱甘肽结合，然后经过几步反应最后形成无毒的硫醚氨酸从胆汁或尿中排出体外而解毒，并提出分布于肝脏胆小管及肾小管上皮的 r-GT 可能参与了硫醚氨酸的形成，并在用致癌剂喂大鼠在胆汁和尿中检测出大量硫醚氨酸得到证实。此外，在化学至癌剂诱发肝癌的动物实验中发现，癌前期 r-GT 活性大大增强，故认为是肝癌癌前诊断的灵敏指标。这些证据都说明肝r-GT在解毒中可能起重要作用。

我们观察了大鼠不同发育期r-GT的分布，发现17—21天胎龄大鼠肝r-GT主要分布于肝细胞内。此后，肝细胞内r-GT逐步向胆小管聚集，新生大鼠肝r-GT则主要分布在胆小管。这种趋向性变化提示在不同发育期大鼠肝 r-GT 可能有不同的生理功能。17—21天胎龄 r-GT 活性主要分布于肝细胞内，可能是参与肝细胞膜的氨基酸转运，以满足胎儿合成蛋白质的需要。出生后肝 r-GT 主要位于胆小管，可能与参于形成硫醚氨酸并有利于其排泄至胆汁中相适应。提示出生后肝 r-GT 可能主要起解毒及解毒产物（硫醚氨酸）的排泄功能。

肺r-GT活性随大鼠发育而逐渐增高，成年大鼠肺r-GT活性是胎儿的 4 倍。组化染色显示在肺内支气管和细支气管上皮细胞中酶活性反应较强（++），肺泡间质为阴性。此与Bodanszky报道结果趋势一致。该结果还提示正常成年大鼠肺r-GT可能参与解毒功能。酶活性集中分布于肺内支气管上皮，可能与呼吸道吸入的毒性物质诱导肺支气管上皮r-GT合成增加有关，可能也象分布于胆小管的r-GT一样，参与硫醚氨酸形成，并有利于排泄至粘液分泌物中。

参考文献

Meister, A. *et al*. 1973 On the enzymology of amino acid transport. *Science*. 180:33

Schulman, J. D. *et al*. 1975 Glutathionuria: inborn error of metabolism due to tissue deficiency of r-glutamyltranspeptidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65:68

Vanderlan, M. *et al*. 1981 r-Glutamyltranspeptidase :a tumour cell marker with a pharmacological function. *Histochem. J*. 13,865

Norman, P. *et al*. 1979 Characterization and physiological function of rat renal r-glutamyltranspeptidase. *Enzyme*. 24:393

Meister, A. *et al*. 1976 Glutathione and related r-glutamyl compounds:Biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem*. 45:559

Bodanszky, H. *et al*. 1980 Pulmonary and hepatic activities of membrance-bound enzymes in man and rat. *Enzyme*. 24:383

Cameron, R. *et al*. 1978 r-Glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocacinogenesis. *Cancer Res*. 38:823

Fiala, S. 1973 Activation by chemical carcinogens of r-glutamyltransferase in rat and mouse Liver. *J. Natl. Cancer inst*. 51:151

Szasz, C. 1976 Reaction-rate method for r-glutamyltransferase activity in serum. *Clin. chem*. 22:2051

Lowry, O. H. *et al*. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. chem*. 193:265

Adjarov, D. *et al*. 1979 Developmental studies on r-glutamyltransferase in rat intiestinal mucosa. *Enzyme* 24:358

Braun, J. P. *et al*. 1983 Gamma glutamyl transferase in domestic animals. *Vet. Res*. Commun. 6:77

Tsuchida, S. *et al*. 1979 Purification of r-glutamyltransferases from rat hepatomasand heperplastic hepatic nodules, and comparison with the enzyme from rat kidney. *Cancer Res*. 39:4200

Laishes, B. A. *et al*. 1978 r-Glutamyl transpeptidase : A positive marker for cultured rat liver cell derived from putative premalignant and malignant lesions. *J. Natl. Cancer inst*. 60(5):1009

Suresh, S. T. *et al*. 1981 r-Glutamyl transpeptidase: catalyic, structural and functional aspects. *Mol*. cell *Biochem*. 39:357

Chasseaud, L. F. *et al*. 1979 The role of glutathione and glutathione s-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res*. 29:175

Fiala, S. *et al*. 1980 r-Glutamyltransferase and the inhibition of azo dye-produced neoplasis by concomitant administration of disulfiram. *J. Natl. cancer inst*. 64(2):267

r-GT ENZYME ACTIVITY AND LOCATION OF LIVER AND LUNG DURING DEVELOPMENT OF RAT

Wang Deching Yang Shuzhen Jin Showlin
(Third Military Medical College chongqing)

The activity and location of r-GT in rat liver and lung were studied during normal developmemt with biochemical and histochemical methods.

It was found that the activity of r-GT in rat liver began to rise from 17-days-old-fetus and reached a high peak at 21-days-old-fetus. At 1 st day after birth, it decreased markedly, 6 th day after birth, it decreased to a low level of adult value. In fetal poriod, r-GT is mainly located in liver cells, but after birth, it is located mainly in the bile canaliculi.

These results seem to indicate that fetal liver r-GT takes part in the transfer of amino acids in cellular membrence of the liver, After birth, it probably takes part in detoxination.

The activity of lung r-GT increases gradually with development. Lung r-GT in adult rats is located in the epithelial cells of branchus. This result seems to indicate that the lung r-GT takes part in detoxination.

Key words Rat Tissue r-Glutamyltransferase

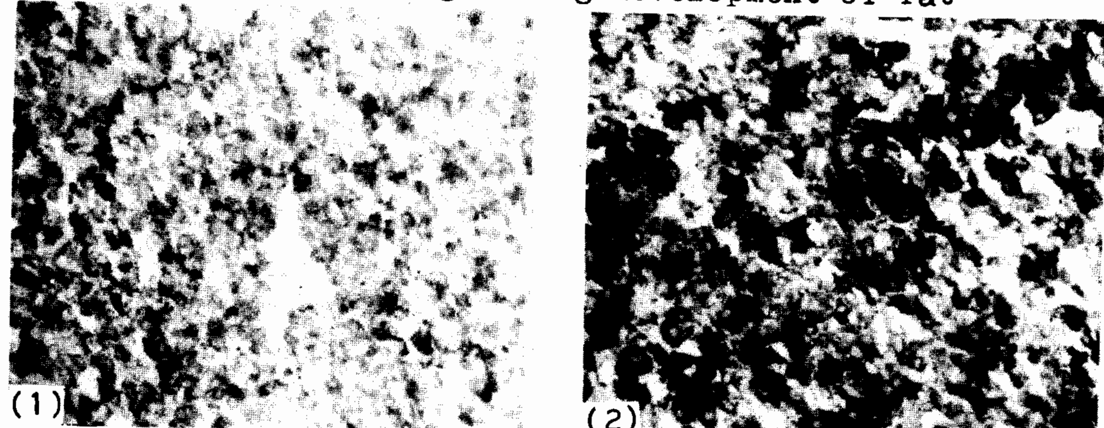
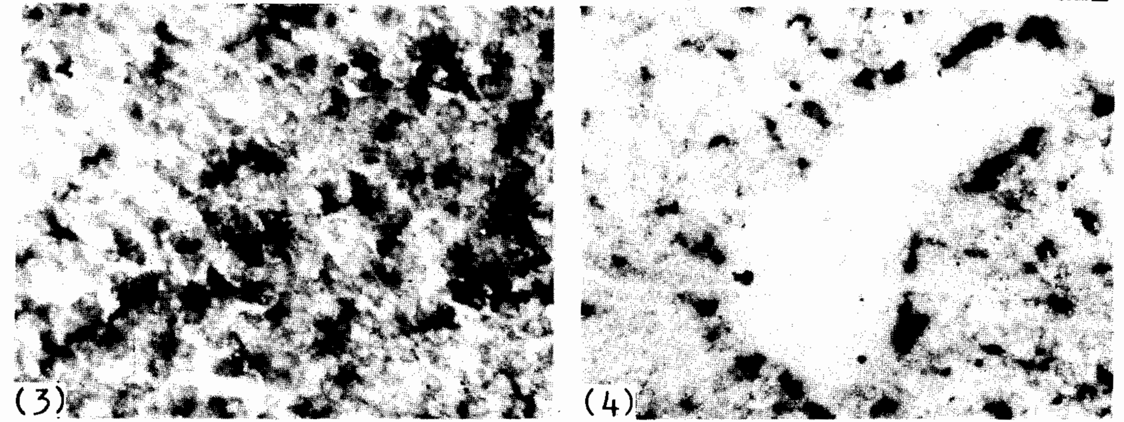


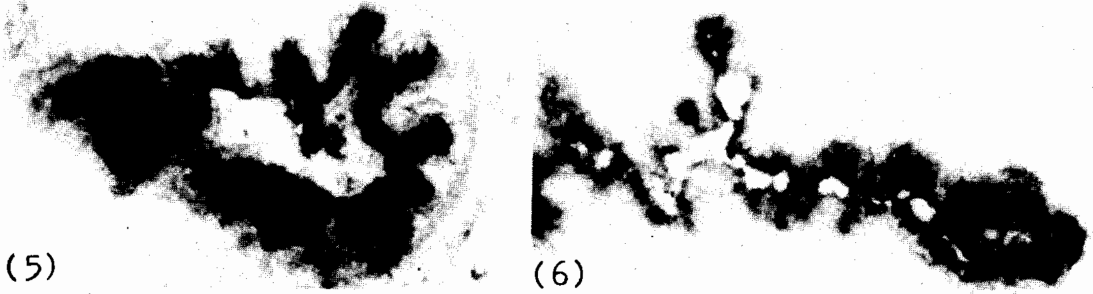
Fig.II (1) ln 19days-old-fetus, r-Gt in rat liver is mainly located in liver cells.

(2) In 21 days-old-fetus, r-GT in rat liver is located both in the liver cells and the bile canaliculi



(3) At 1st day after birth, r-GT in rat liver is located mainly in the bile canaliculi. It is sparsly dispersed in the liver cells.

(4) At 3rd day after birth, r-GT in rat liver is mainly located in the bile canaliculi.



(5) Lung r-GT in adult rat is located in the intrapulmonary bronchi.

(6) Lung r-GT in adult rat is located in the bronchioles.